



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1990054 B

(45) 授权公告日 2011. 09. 07

(21) 申请号 200510112068. X

24. 2004, 4(24), 242-245.

(22) 申请日 2005. 12. 27

审查员 陈安玥

(73) 专利权人 上海国睿生命科技有限公司

地址 201109 上海市闵行区剑川路 468 号

(72) 发明人 曹谊林 周广东 刘天一 刘伟

崔磊

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 徐迅

(51) Int. Cl.

A61L 27/44 (2006. 01)

C12N 5/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1565644 A, 2005. 01. 19, 全文.

CN 1507927 A, 2004. 06. 30, 权利要求 1, 6.

US 6863900 B2, 2005. 03. 08, 全文.

舒朝锋. 应用 hMSCs-脱钙骨复合体内构建软骨组织的实验研究. 上海第二军医大学学报 4

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种体外诱导人骨髓基质干细胞构建软骨的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种组织工程化软骨移植物, 它包括:(a) 人骨髓基质干细胞 (human bone marrow stem cells, hBMSCs); (b) 药学上可接受的, 生物相容性良好的可降解材料。本发明的组织工程化软骨可有效地进行软骨缺损的移植治疗。本发明还提供了该组织工程化软骨的具体构建方法和多种用途。

1. 一种组织工程化软骨移植物,其特征在于,它包括:

- (a) 人骨髓基质干细胞 hBMSCs ;
- (b) 药学上可接受的生物可降解材料 ;

所述的移植物通过下述方法制备得到:

将 hBMSCs 与药学上可接受的生物可降解材料混合,形成复合物,联合应用体外诱导剂,所述的体外诱导剂包含:TGF- β_1 、IGF-I 和地塞米松;体外诱导剂的应用时间为细胞接种到材料上之后 24-148 小时,体外诱导时间为 4-10 周。

2. 如权利要求 1 所述的移植物,其特征在于,所述的 hBMSCs 是自体细胞,来源于髌骨、胸骨、和 / 或肋骨。

3. 如权利要求 1 所述的移植物,其特征在于,所述的移植物为固态细胞材料复合物,且 hBMSCs 在复合物中的浓度为 1×10^6 个细胞 / cm^3 - 5×10^8 个细胞 / cm^3 。

4. 如权利要求 1 所述的移植物,其特征在于,所述的药学上可接受的生物可降解材料选自下组:聚乳酸 (PLA)、聚羟基乙酸 (PGA)、PLGA、聚羟基丁酸、聚酸酐、聚偶磷氮、聚氨基酸、假聚氨基酸、聚原酸酯、聚酯尿烷、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚对二氧六环酮、胶原、明胶、透明质酸、糖氨聚糖、壳聚糖、甲壳素、海藻酸盐、脱细胞基质,及其共聚物或混合物。

5. 如权利要求 1 所述的移植物,其特征在于,移植物外形为人耳廓、鼻背、鼻翼、下颏、颧弓、眉弓、管状、菱形、片状、或圆柱状。

6. 一种如权利要求 1 所述的组织工程化软骨移植物的制备方法,其特征在于,包括步骤:

将 hBMSCs 与药学上可接受的生物可降解材料混合,形成复合物,其中 hBMSCs 在复合物中的浓度为 1×10^6 个细胞 / cm^3 - 5×10^8 个细胞 / cm^3 ;联合应用体外诱导剂,所述的体外诱导剂包含:TGF- β_1 、IGF-I 和地塞米松;体外诱导剂的应用时间为细胞接种到材料上之后 24-148 小时,体外诱导时间为 4-10 周。

7. 如权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于,所述的体外诱导剂中 TGF- β_1 的浓度为 20-50ng/ml、IGF-I 的浓度为 100-500ng/ml、地塞米松的浓度为 10-60ng/ml。

8. 如权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于,所述的药学上可接受的生物可降解材料选自下组:聚乳酸 (PLA)、聚羟基乙酸 (PGA)、PLGA、聚羟基丁酸、聚酸酐、聚偶磷氮、聚氨基酸、假聚氨基酸、聚原酸酯、聚酯尿烷、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚对二氧六环酮、胶原、明胶、透明质酸、糖氨聚糖、壳聚糖、甲壳素、海藻酸盐、脱细胞基质,及其共聚物或混合物。

一种体外诱导人骨髓基质干细胞构建软骨的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学和生物医学工程领域,更具体地涉及利用人骨髓基质干细胞(hBMSCs)构建组织工程化软骨及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 外伤、感染、肿瘤或骨关节炎等疾病均可以导致软骨的损伤,由于软骨组织中缺少干细胞和血供,损伤后自我修复能力很低,即使在某些区域存在少量自身修复的现象(如小面积关节软骨损伤后可以再生),但修复的组织往往是纤维组织和软骨组织并存的复合物,缺少完整的化学组分和足够的力学特性,无法发挥正常软骨的功能。而某些支架性软骨如耳廓软骨,在损伤或感染后更是完全丧失修复能力,导致器官外形严重畸形。因此,软骨损伤性或缺损性疾病的治疗向临床医生提出了巨大的挑战。

[0003] 到目前为止,较为多用的治疗手段包括:自体软骨的游离或带蒂移植(主要取自肋软骨)、异体软骨的游离移植、自体 and 异体的软骨细胞注射移植、骨膜或软骨膜移植、体内应用 IGF 等生长因子促再生治疗、关节软骨下骨钻孔法等。尚有应用赝复体治疗方法,如使用膨体聚四氟乙烯等高分子材料制成的耳廓支架,或固体硅橡胶制成的鼻背形支架来进行局部支撑或充填。

[0004] 但这些方法均存在明显的缺点,如:自体软骨移植是以牺牲正常组织为代价的,植入后软骨在体内会发生一定程度的缩小和变形。患者不但要在取材时遭受另外一次手术的痛苦,还容易出现气胸、胸廓塌陷和瘢痕等供区并发症。此外,更为关键的是自体软骨来源非常有限。异体和异种移植物不但具有免疫原性可引起受体的免疫排斥反应,而且有传播艾滋病、肝炎等病原体的危险。

[0005] 虽然人工合成的软骨组织代用品具有制作简单,使用方便的优点,但是替代材料只具备充填、支持及维持美观的作用,缺少软骨生物学功能,不是真正意义上的结构与功能重建,而且,作为异物,它的组织相容性差,经常出现移植部位疼痛、人工代用品外露等问题,无法满足患者的治疗要求。

[0006] 组织工程技术综合了细胞生物学、工程学、材料学和外科学等学科,在体外或体内应用有活力的种子细胞、可降解的生物材料和信号分子等来获得有活力有功能的组织。它的优点在于从病人损伤相对轻微的部位获取少量标本,分离出其中的细胞,进行体外培养及大规模扩增。再将扩增后的活细胞接种到具有合适的化学成分和物理构型的,天然或人工合成的可降解、生物相容性良好的高分子材料上,通过体外培养或同时加入各类生物活性因子及生物力学刺激,构建出组织工程化移植物,并用于组织或器官缺损的功能重建。它为软骨损伤性或缺损性疾病的治疗带来了新的希望。

[0007] 按照组织工程的原则,Vacanti 等已经用牛软骨细胞和聚乙酸、聚乳酸复合支架成功构建出透明软骨组织。曹谊林等应用组织工程技术在裸鼠的背上成功地再造了精确人耳形态的软骨,之后的大量研究表明,在高等大型哺乳动物甚至人体内也可以利用组织工程技术再生软骨组织,但这些研究所应用的种子细胞均为软骨细胞,在临床的应用受到了很

大的限制,主要是因为自体或异体软骨细胞来源有限取材创伤大,体外大量扩增又会发生老化与去分化,失去软骨细胞的表型。生长因子虽可在一定程度上扩增软骨细胞,但其费用昂贵,所形成组织在体内的长期效果尚不肯定。

[0008] 许多作者尝试应用外源性生长因子诱导动物 BMSCs 向软骨细胞分化进行,动物包括兔、马、大鼠、猪、羊等,应用的生长因子主要为 TGF- β 1、IGF-I、PDGF、TGF- β 3、BMP-6、地塞米松等。文献报道中大多应用三维立体的条件培养,包括 micromass 微团块培养或者不同工艺材料的三维支架培养。经 6 周以上时间的诱导培养后形成了具有典型的软骨组织结构,同时具备一定含量软骨特异性基质成分和一定力学强度的软骨组织,说明了利用外源性生长因子诱导 BMSCs 构建软骨组织是完全可行的。我们采用猪 BMSCs 为种子细胞,首次建立了包括 TGF- β 1、IGF-I 和地塞米松等诱导因子的组合诱导剂,体外成功构建出结构和力学特性良好的软骨组织,并进一步通过体内实验验证了体外构建软骨移植体内后可以进一步成熟,证实了猪 BMSCs 构建软骨完全可行。

[0009] 但是,人 BMSCs 与动物细胞具有本质上的区别,包括细胞的增殖能力、分化能力、细胞表面抗原、对外源性诱导剂的反应能力等等,虽然许多作者尝试应用人 BMSCs 构建软骨组织,但是存在以下几方面关键性问题:1、生长因子的诱导效能不佳;2、生长因子的诱导作用缺乏特异性;3、软骨特异性的基质合成和分泌量少;4、体外构建组织力学强度不佳;5、构建组织内外分布不均匀;6、构建特殊形状(如耳廓、鼻翼等)软骨较困难。这些困难严重影响了人 BMSCs 的体外软骨构建和临床应用。

[0010] 因此本领域迫切需要开发安全性高、组织相容性好、具有生物学功能的组织工程化人软骨移植体。

发明内容

[0011] 本发明的目的就是提供一种使用安全、制备简便的组织工程化软骨。

[0012] 本发明的另一目的就是提供所述组织工程化软骨的制法方法和用途。

[0013] 在本发明的第一个方面,提供了一种组织工程化软骨移植体,它包括:

[0014] (a) 人骨髓基质干细胞 hBMSCs;

[0015] (b) 药学上可接受的生物可降解材料。

[0016] 其中所述的 hBMSCs 是自体细胞,来源于髌骨、胸骨、肋骨等松质骨。

[0017] 在另一优选例中,所述的移植体为固态细胞材料复合物,且 hBMSCs 在复合物中的浓度为 1×10^6 个细胞 / cm^3 - 5×10^8 个细胞 / cm^3 , 优选 2×10^7 个细胞 / cm^3 - 7×10^7 个细胞 / cm^3 。hBMSCs 在复合物中的含量为 1×10^6 个细胞 / 克 - 5×10^8 个细胞 / 克, 优选 2×10^7 个细胞 / 克 - 7×10^7 个细胞 / 克。

[0018] 在本发明所述的移植体中,所述的药学上可接受的生物可降解材料选自下组:聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、PLGA、聚羟基丁酸、聚酸酐、聚偶磷氮、聚氨基酸、假聚氨基酸、聚原酸酯、聚酯尿烷、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚对二氧六环酮、胶原、明胶、透明质酸、糖氨聚糖、壳聚糖、甲壳素、海藻酸盐、脱细胞基质,及其共聚物或混合物。

[0019] 其中所述的移植体外形为人耳廓、鼻背、鼻翼、下颏、颧弓、眉弓、管状、菱形、片状、圆柱等多种形状但不仅限于此。

[0020] 在本发明的第二个方面,提供了一种如上所述的组织工程化软骨移植体的制备方

法,包括步骤:将 hBMSCs 与药学上可接受的生物可降解材料混合,形成复合物,其中 hBMSCs 在复合物中的浓度为 2×10^7 – 5×10^7 个细胞/cm³。

[0021] 所述的制备方法中联合应用体外诱导剂,所述的体外诱导剂包含:TGF- β_1 、IGF-I 和地塞米松。

[0022] 在另一优选例中,所述的体外诱导剂中 TGF- β_1 的浓度为 20–50ng/ml、IGF-I 的浓度为 100–500ng/ml、地塞米松的浓度为 10–60ng/ml。

[0023] 在另一优选例中,所述的体外诱导剂的应用时间为细胞接种到材料上之后 24–148 小时,体外诱导时间为 4–10 周。

[0024] 在另一优选例中,将体外诱导剂以直接脉冲的方式滴加在复合物上

[0025] 在另一优选例中,直接脉冲方式滴加在复合物上的间隔时间为 24–96 小时,更佳地 24–48 小时

[0026] 在另一优选例中,体外诱导剂的应用时间为细胞接种到材料上之后 24–48 小时,体外诱导时间为 6–8 周

[0027] 在上述的制备方法中,所述的药学上可接受的生物可降解材料选自下组:聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、PLGA、聚羟基丁酸、聚酸酐、聚偶磷氮、聚氨基酸、假聚氨基酸、聚原酸酯、聚酯尿烷、聚碳酸酯、聚乙二醇、聚环氧乙烷、聚对二氧六环酮、胶原、明胶、透明质酸、糖氨聚糖、壳聚糖、甲壳素、海藻酸盐、脱细胞基质,及其共聚物或混合物,但不仅限于此。

[0028] 由此本发明获得了一种安全、制备简便的组织工程化软骨,并可将它用于软骨移植中。

附图说明

[0029] 图 1 显示了体外诱导培养 8 周的大体标本。

[0030] 图 2 显示了体外诱导培养 8 周的 HE 染色结果。

[0031] 图 3 显示了体外诱导培养 8 周的 Safranin-O 染色结果。

[0032] 图 4 显示了体外诱导培养 8 周的甲苯胺蓝染色结果。

[0033] 图 5 显示了体外诱导培养 8 周的 II 型胶原免疫组化染色结果。

[0034] 图 6 显示了软骨特异性胞外基质均染均匀而丰富。

[0035] 图 7 显示了软骨特异性胞外基质均染均匀而丰富。

具体实施方式

[0036] 本发明人在严谨的实验工作中发现, hBMSCs 获取容易,可以通过密度梯度离心或者贴壁法分离出骨髓中的 hBMSCs,经体外的扩增后细胞数量明显增加,在第 2 代时可达到原细胞量的 30–100 万倍,对细胞进行特性鉴定发现细胞仍能够保持干细胞特性,具有自我更新的能力,更为重要的是细胞能够在 TGF- β_1 、地塞米松和 IGF-I 等生长因子联合诱导下分化为软骨样细胞,并能够分泌 II 型胶原和蛋白聚糖。说明这种细胞具备作为软骨构建种子细胞的条件,进而将细胞接种到 PGA 为主要材料做成的三维多孔支架上,再进行三维诱导培养,发现细胞能够很好地与材料粘附并分泌蛋白聚糖和 II 型胶原等软骨特异性细胞外基质,在基质逐渐增多包埋细胞和支架的同时,PGA 纤维等支架逐步降解消失,最终在体

外形成了成熟的软骨组织,这完全符合组织工程技术的基本原理。为了解这种成体干细胞构建的软骨能否在皮下环境中长期存留,我们将体外构建 4 周的软骨植入裸鼠皮下,4 周后发现植入的软骨仍能够保持原有的大小和形状,而且生物力学性质有了明显改进。最近,体外构建较大的片状软骨 (30mm×20mm) 也获得成功。

[0037] 人们注意到骨髓基质中有一类被称之为“骨髓间充质干细胞 (BMSCs)”的非造血细胞亚群,这些细胞能够在体内或体外进行扩增和诱导,最终分化为成骨细胞、脂肪细胞、肌腱细胞、神经细胞和生血基质等。在有地塞米松、TGF- β_1 、TGF- β_3 等诱导因子存在下,BMSCs亦能在体外直接被诱导成为软骨样细胞。相比软骨细胞,BMSCs 具有更多的优点,它们来源广泛,取材时供区损伤轻微,在体外又能够大量扩增,最终可得到活力好、数量充足的细胞。这为我们构建自体或同种异体软骨提供了一个新的种子细胞来源。

[0038] 术语

[0039] 本发明所用的术语“骨髓间充质干细胞 (BMSCs)”和“骨髓基质干细胞”可相互替换使用。

[0040] 术语“hBMSCs 的分离”指将存在于动物骨髓中的基质干细胞由骨髓的多种细胞群体中选取出来的过程。

[0041] 术语“hBMSCs 的扩增”指为了获取大量 hBMSCs 而在体外环境中大量增殖的过程。

[0042] 术语“诱导”指提供特殊的生化环境,将具有多向分化能力的干细胞等细胞群体转变为另一种功能特性不同的细胞群体的过程。

[0043] 术语“接种”指将细胞均匀分布于三维支架材料上的过程。

[0044] 术语“自体移植”指将所需生物活体材料(如骨髓基质干细胞)从某个体中取出并再施用于同一个体的过程。

[0045] 术语“直接脉冲式滴加”指将生长因子按着要求剂量配制好之后直接滴加在细胞材料复合物上,然后后添加培养液,间隔一段时间后重复滴加生长因子。

[0046] hBMSCs

[0047] 本发明中 hBMSCs 的来源没有特别限制,一种优选的来源是来自自体的骨髓。

[0048] 分离获得 hBMSCs 的方法是文献多次报道的公认方法。一种优选的方法是全麻下或局麻下骨髓穿刺抽取自体骨髓,以密度梯度离心法分离出其中的有核细胞,加入合适的培养液(如含有 10%胎牛血清, L-谷氨酰胺 300ug/ml, 维生素 C50ug/ml, 青、链霉素各 100U/ml 的 DMEM 培养液),制成细胞悬液,以约 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养皿,于 37℃、5% CO₂、100%饱和湿度的条件下培养。48 小时后首次换液,以后隔日换液继续培养。待细胞生长近汇合后,以 0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA 消化,以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度接种进行细胞传代。优选第 2~15 代细胞用于制备人工软骨。

[0049] 一类优选的 hBMSCs 分离培养方法是全骨髓分离培养法,在抽取骨髓后进行多次洗涤,以约 6×10^5 个有核细胞 / cm^2 的密度(但不仅限于此密度)经上述培养液稀释后接种于培养皿中,静态培养 5 天左右,使多数骨髓基质细胞(包括骨髓基质干细胞)充分贴壁,再经多次冲洗和换液去除红细胞及其它未贴壁的细胞,待细胞生长近汇合后常规消化、传代,在培养扩增过程中可使 hBMSCs 逐步纯化。优选体外培养的第 2 代~第 9 代 hBMSCs 进行软骨构建,此时的 hBMSCs 有较强的增殖能力并具有多向分化的潜能,包括向软骨细胞分化的潜能。

[0050] 生物可降解材料

[0051] 可用于本发明的组织工程化软骨的材料是医学上可接受的生物可降解材料,包括(但并不限于):

[0052] (a) 可降解性合成高分子材料,例如聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、PLGA、聚羟基丁酸(PHB)、聚酸酐(polyanhydrides)、聚偶磷氮(polyphosphazenes)、聚氨基酸(polyamino acid)、假聚氨基酸(pseudo-polyamino acid)、聚原酸酯(polyorthoesters)、聚酯尿烷(polyesterurethane)、聚碳酸酯(polycarbonate)、聚乙二醇、透明质酸、聚对二氧六环酮(polydioxanone)等;

[0053] (b) 天然可降解材料,例如胶原(collagen)、明胶(gelatin)、糖氨聚糖(glycosaminoglycan, GAGs)、壳聚糖(chitosan)、甲壳素(chitin)、海藻酸盐以及各种脱细胞基质等;

[0054] (c) 上述材料的共聚物或复合型材料,尤其是高分子材料与天然材料的复合材料,以及固体材料与可注射性材料的复合材料。

[0055] 优选的医学上可接受的生物可降解材料是固体材料或固、液体复合材料,例如聚乳酸(PLA)、聚羟基乙酸(PGA)、胶原等。本发明中的材料可预制成各种精确的大小与形状,以适应不同大小和形状的软骨组织构建。当材料为固体型材料时,可以直接将材料预制成需要的大小与形状,也可以通过计算机辅助及快速成型技术定制的模型对材料进行精确的塑性。

[0056] hBMSCs-生物材料复合物

[0057] 本发明中hBMSCs-生物材料复合物的细胞接种浓度通常约为 2×10^7 /ml至 7×10^7 /ml或更高。材料为固体性材料或者固、液体复合材料,以培养液调整细胞浓度,然后与固体性材料混合,其中混合时培养液与固体性材料的比例没有特别限制,但是以该固体材料所能够吸附培养液的最大量为准。当支架材料为特殊三维形状时,如耳廓或鼻背形,按实际体积的大小来进行计算。

[0058] 制备方法

[0059] 本发明的组织工程化软骨的制备方法简便,将一定数量的所述hBMSCs与药学上可接受的生物可降解材料混合,再经体外诱导即可。

[0060] 在本发明的组织工程化软骨移植构建软骨过程中,主要以TGF- β_1 、IGF-I和地塞米松等生长因子进行体外诱导,也可优选添加或复合其它各种细胞因子或生长因子,如BMP-2、CDMP等,从而加速诱导过程及提高细胞外基质合成能力等。

[0061] 一定剂量的TGF- β_1 、IGF-I和地塞米松诱导组合可以高效诱导hBMSCs成软骨分化,但是诱导猪BMSCs的剂量应用于hBMSCs无法达到良好的诱导效能,必须要加大生长因子的应用剂量。在一个优选例中,TGF- β_1 的浓度为20-50ng/ml、IGF-I的浓度为100-500ng/ml、地塞米松的浓度为10-60ng/ml可以达到稳定高效的诱导效能。

[0062] 既往在猪BMSCs接种到材料上7天后开始诱导,但应用于hBMSCs后发现细胞外基质合成量明显低下,在一个优选例中,细胞接种到材料上之后24-48小时开始诱导明显促进胞外基质合成量,增加组织成熟度。

[0063] 既往对猪BMSCs采取持续性体外诱导剂刺激,但是该诱导方法对hBMSCs的诱导效能不强,优选地,采用直接脉冲式滴加在复合物上的方法,间隔时间为24-48小时,明显增

强诱导效能。

[0064] 本发明的组织工程化软骨移植物构建软骨过程中,主要为静态培养,或者以离心或振荡的方式加入力学刺激,也可以通过软骨生物反应器模拟体内软骨的力学环境,对体外构建的软骨施加类似的力学刺激,促进软骨的成熟与力学性质的改进。

[0065] 用本发明方法形成的组织工程化软骨,即 hBMSCs 与固体性生物材料构成的复合物,该复合物经体外充分诱导后可植入体内皮下或软骨缺损部位。

[0066] 一例用 hBMSCs 与培养液制成浓度为 5×10^7 /ml 的细胞悬液(不仅限于此浓度),然后与聚羟基乙酸(PGA)为主的生物支架材料形成复合物(复合物大小、形状依照软骨缺损的大小及形状确定)。该复合物经体外诱导培养6周至8周(不仅限于此时间,期间每3至4天换液一次,以保证细胞营养),当体外组织工程化软骨初步形成时植入体内皮下或相应的软骨缺损部位。亦可将材料制作成具有精细结构外形的三维支架,再接种 hBMSCs 进行体外诱导,经6-8周(不仅限于此时间)后植入体内软骨缺损部位。

[0067] 应用本发明确定的方法,可以成功诱导 hBMSCs 构建出了具有良好组织学结构、生物化学组成和力学强度的软骨组织,这种组织能够满足皮下移植不变形的要求。通过这些条件优化组合,取得的诱导效果相当稳定而特异,这为软骨缺损的修复重建提供了坚实的实验基础和技术基础。

[0068] 应用方法

[0069] hBMSCs 与可降解固态生物材料形成复合物后,在体外进行诱导培养,当适合软骨缺损大小和形状的组织工程化软骨形成后,再植入体内软骨缺损部位。

[0070] 本发明的主要优点在于:

[0071] (1) 应用自体细胞,且一次取材既可获得足够的细胞量;

[0072] (2) 骨髓穿刺操作简单,对病人损伤极小,无需住院,且可以重复取材;

[0073] (3) 体外培养方法简单易学,便于推广应用;

[0074] (4) 体外诱导方法操作简便,诱导效果确切可靠;

[0075] (5) 可按软骨缺损大小和形状预制移植物的形状,以达到精确的修复;

[0076] (6) 培养过程便于标准化,易于形成产业化产品。

[0077] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 Sambrook 等人,分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0078] 实施例 1

[0079] hBMSCs 的获取和培养

[0080] 细胞取自人胸骨或者髂骨,供体年龄 8-36 岁,身体健康,无恶性肿瘤、传染性疾病及血液系统疾病。

[0081] (1) 取材:麻醉满意后,常规消毒铺巾,16 号穿刺针于胸骨或者髂骨部位穿刺,抽取骨髓 6 ~ 8ml,置于肝素化的离心管中。

[0082] (2) 分离有核细胞(以密度梯度离心法为例):将抽取的骨髓先后用 5ml 和 1ml 空针反复抽吸数次,转移至另一离心管内,加入少量的无血清 DMEM 培养液,混匀,3000rpm 离心 10 分钟,轻轻吸除脂肪及大部分上清液,注意不要搅动下方的沉淀物,重新振荡混匀,在

另一 15ml 离心管内加入新鲜配制的 Percol 分离液 (购自 Pharmacia 公司), 分离液表面轻轻加入上述的骨髓细胞悬液 (体积为分离液的一半), 900g 离心 30 分钟, 此时离心管内液体分为四层: 第一层主要是血清和少量的培养液, 第二层为有核细胞层, 第三层为 Percol 分离液, 第四层主要是沉淀下来的红细胞。轻轻吸取第二层的有核细胞转移至另一离心管内, 加入适量的无血清 DMEM 培养液洗涤离心二次。

[0083] (3) 接种: 弃上清, 细胞以含有 10% 胎牛血清, L- 谷氨酰胺 300ug/ml, 维生素 C50ug/ml, 青、链霉素各 100U/ml 的 DMEM (购自 Gibco, Gland Island, NY, USA) 培养液制成细胞悬液, 取少量细胞悬液用 4% 乙酸等体积稀释破坏残存的红细胞, 常规计数有核细胞数, 以 $2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养皿, 常用的 100mm 塑料培养皿接种有核细胞 1.5×10^7 左右, 加入细胞悬液 9 ~ 10ml 既可。

[0084] (4) 培养与传代: 将接种好的培养皿置于 37°C、5% CO₂、100% 饱和湿度的条件下, 培养 48 小时后首次换液, 此时在低倍镜下可清楚地见到多个克隆形成, 吸除旧培养液, PBS 洗涤 2 ~ 3 次, 加入新鲜培养液, 继续在相同的条件下培养, 隔日更换三分之二量的培养液, 一般 4 ~ 5 天后可达到融合状态, 可继续传代培养。传代时吸除培养液, 以少量 PBS 洗涤一次, 加入 1.5-2.0ml 的消化液 (含 0.02% EDTA 及 0.25% 胰蛋白酶的 PBS), 镜下见大部分细胞胞质回缩、形态变圆后, 轻轻吸除消化液, 加入适量的含血清的 DMEM 条件培养液中中止消化, 收集细胞悬液、计数, 以 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 细胞密度接种于新的培养皿内, 继续在相同的条件下培养。隔日更换三分之二量的培养液, 一般 4 ~ 5 天后又可达到融合状态, 可继续传代培养。以第 2 ~ 6 代细用于实验效果较佳。

[0085] 倒置显微镜下观察, hBMSCs 呈长梭形或多角形, 原代细胞多呈克隆样生长, 传代后可形成单层, 细胞接近会合时排列呈旋涡形。

[0086] 实施例 2

[0087] PGA 三维支架的制作

[0088] 无纺 PGA 纤维购自 Albany 公司 (Albany, NY, USA), 真空保存。纤维直径 13-15 μm。将 PGA 纤维精确称量为 6mg/ 块, 用特制的模具压制直径 5mm、厚 2mm 的圆柱体小块, 待形状固定后, 将材料支架完全浸入到 75% 乙醇中消毒 30 分钟。PBS 冲洗 3 遍, 再用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基浸泡 10 分钟, 吸干后准备接种细胞。

[0089] 实施例 3

[0090] 细胞接种、复合物诱导培养

[0091] 单层培养的第二代 hBMSCs 达到 90% 汇合时, 应用 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化。细胞收集后用细胞计数仪计数, 台盼蓝染色显示活细胞数多于 95%, 1500rpm 离心 5min 使细胞沉淀, 弃去上清液, 振荡分散细胞, 按 5×10^7 个细胞 / cm³ 的密度将细胞悬液接种到圆柱形支架上。共制作 24 块 hBMSCs-PGA 复合物, 均于接种后在 37°C、5% CO₂、100% 湿度的环境中静态培养 24 小时。其中 20 块复合物培养液应用软骨诱导液直接脉冲式滴加诱导刺激, 具体成分包括: 高糖 DMEM, 10% FBS, 50ng/ml TGF-β₁, 100ng/ml IGF-I 和 40ng/ml 地塞米松。其余 4 块复合物继续应用 DMEM 培养基。所有构建复合物在体外培养 8 周后取材检测。

[0092] (a)、大体观察

[0093] 体外诱导培养 4 周时, 诱导组细胞-材料复合物能够保持原有的大小和形状, 外观已类似软骨组织, 质地柔韧并有一定弹性; 未诱导组细胞-材料复合物明显缩小变形, 暗褐

色,质地柔软无弹性。8周后,复合物仍能够维持原大小与形状,外观上与正常软骨更为接近,硬度与弹性均有所提高。见图1

[0094] (b)、组织学检查

[0095] HE染色:体外诱导4周时即可见软骨陷窝样结构,但成熟的软骨陷窝数量少,PGA纤维仍较多见,中央部位无细胞和基质沉积,未诱导组含有大量纤维组织和支架材料,极少见到成熟的软骨陷窝样结构。8周后,成熟软骨陷窝数量明显增多,胞外基质染色加深。见图2

[0096] Safranin-O染色:本发明培养组新生软骨均有阳性染色。见图3

[0097] 甲苯胺蓝染色:体外诱导培养组细胞外基质中均有大量胶原沉积,而未诱导组染色明显偏淡。见图4

[0098] II型胶原免疫组化:体外诱导培养组细胞外基质中较强阳性表达,表明有大量软骨特异性II型胶原沉积,而未诱导组为阴性。见图5

[0099] 实施例4

[0100] 细胞-生物支架复合物形成及体内植入与取材

[0101] 单层培养的第二代hBMSCs达到90%汇合时,应用0.25%胰酶+0.02%EDTA消化。细胞收集后用细胞计数仪计数,台盼蓝染色显示活细胞数多于95%,1500rpm离心5min使细胞沉淀,弃去上清液,振荡分散细胞,按 5×10^7 个细胞/cm³的密度将细胞悬液接种到圆柱形支架上。共制作24块hBMSCs-PGA复合物,均于接种后在37℃、5%CO₂、100%湿度的环境中静态培养24小时。其中20块复合物培养液应用软骨诱导液直接脉冲式滴加诱导刺激,具体成分包括:高糖DMEM,10%FBS,50ng/mlTGF- β_1 ,100ng/mlIGF-I和40ng/ml地塞米松。其余4块复合物继续应用DMEM培养基。4周后所有构建复合物行裸鼠皮下移植,体内培养4周后取材,对所形成的软骨组织进行评价。

[0102] 大体观察及组织学检查

[0103] 体内植入4周后,诱导后的细胞材料复合物可在裸鼠皮下形成组织工程化软骨,新生软骨均呈乳白色,质实,有一定的弹性,周围包绕软组织膜,未见明显的血管长入软骨内。并且构建组织与正常软骨组织学形态相近,均有成熟的软骨陷窝形成,软骨特异性胞外基质均染均匀而丰富(图6,7)。

[0104] 讨论

[0105] 通过上述实例可以证实,hBMSCs与PGA三维支架材料制成的细胞-材料复合物,在体外培养过程中持续性给予TGF β_1 、IGF-I等外源性生长因子以及甾体类激素的刺激与诱导,8周时能够形成结构完整的成熟软骨组织,并在软骨组织形成过程中PGA逐渐被降解;未诱导组细胞-材料复合物在培养过程中逐渐收缩,组织学及免疫组化结果只见到及少量的软骨样组织形成。这表明接种在三维支架上的hBMSCs在TGF β_1 等诱导因子作用下可以被诱导成为软骨样细胞,并且分泌软骨的细胞外基质成分,最终在体外形成成熟的软骨组织。

[0106] 为观察hBMSCs构建的组织工程化软骨能否在体内皮下环境中较长期存留且保持一定的外形,我们将体外诱导培养4周时构建的软骨样组织植入裸鼠皮下,体内4周后发现所形成的组织更加接近于体内正常软骨组织,说明体外构建的软骨完全可以用于体内移植及软骨缺损的修复。这些结果充分证实了体外应用生长因子诱导hBMSCs构建软骨组织是

可行的。当然,这些实例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。如果再结合转基因技术与生物反应器技术,则体外构建的软骨会更加成熟,而且成本也会大大降低,并有可能形成产业化的组织工程化软骨产品。

[0107] 本发明为应用 hBMSCs 构建软骨提供了一个确实可行的技术体系,使用这种技术提供的简便方法,可以有效地体外诱导 hBMSCs 形成软骨组织并能够在体内进一步成熟。本发明人认为 TGF- β_1 、IGF-I 和地塞米松等诱导因子均可能在不同程度上启动和维持了 hBMSCs 向软骨细胞分化的过程,而 IGF-I 更可能体现在对软骨样细胞功能表达的促进作用上,本发明确定的生长因子应用剂量和方法恰恰能够充分发挥各诱导剂对 hBMSCs 的促分化作用。而今后在本研究的基础上,应用转染 TGF- β_1 和 / 或 IGF-I 基因的 hBMSCs 作为种子细胞,不但克服了外源性细胞因子分布不均的缺点,而且节约成本,更加具有实际的应用意义。

[0108] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

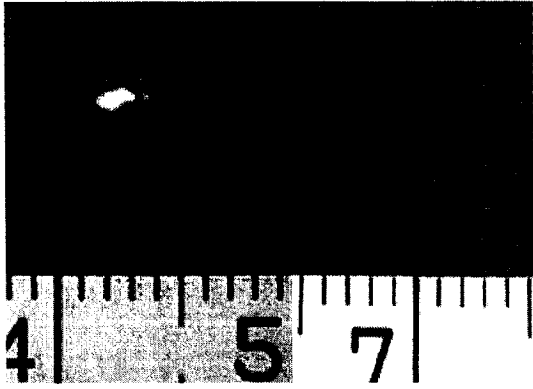


图 1

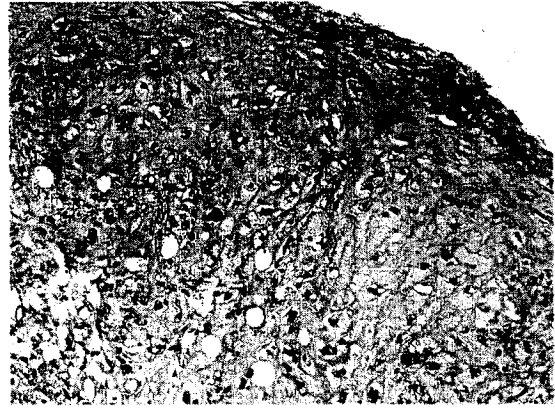


图 2

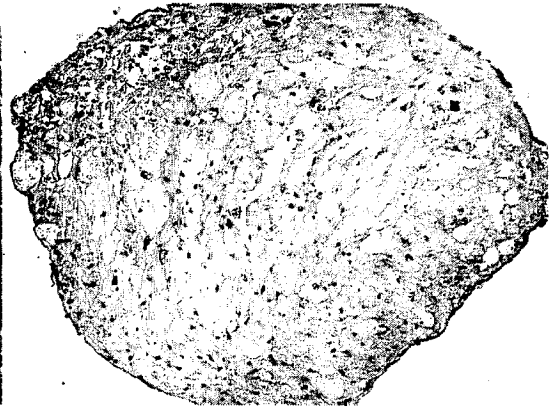
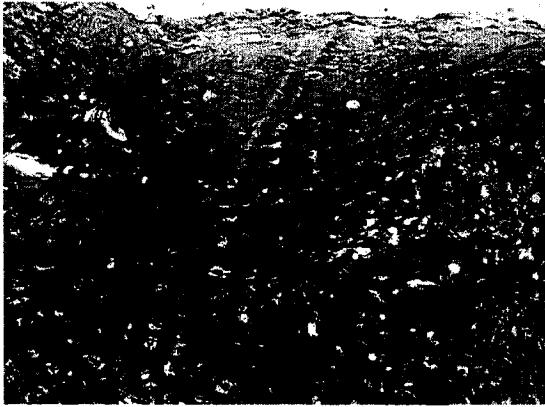


图 3



图 4

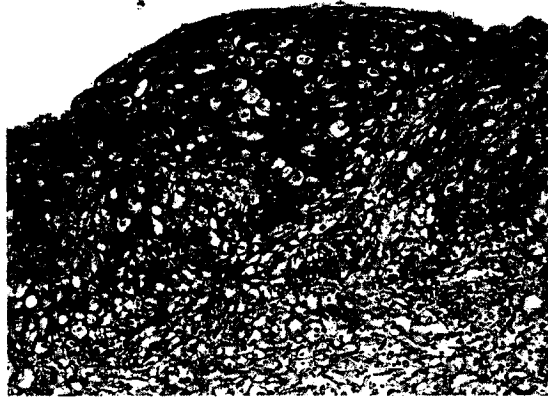


图 5

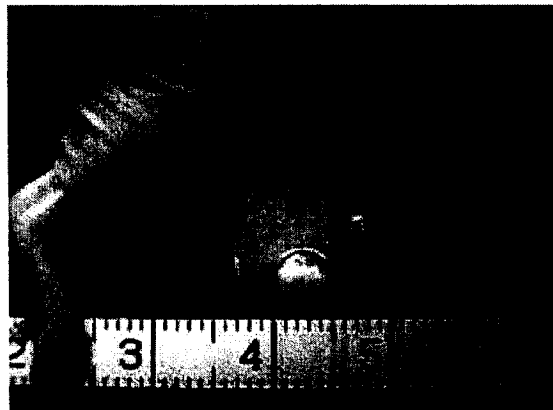


图 6

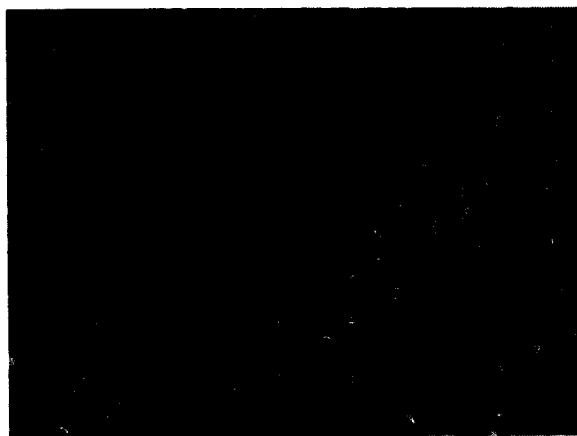


图 7